

核酸与有机小分子反应机理的荧光特性研究

张 诺, 吴 丹, 韩颜颜, 蔡燕燕, 李 茹, 赵燕芳, 魏 琴*

济南大学化学化工学院, 山东省氟化学化工材料重点实验室, 山东 济南 250022

摘 要 核酸与有机小分子的反应机理对认识核酸的结构与功能具有重要作用,也是揭示核酸的生物功能与一些药物的作用机制的重要途径。研究核酸与有机小分子之间的相互作用对生命过程的模拟和生命本质的探索具有十分重要的意义,并对近年来该领域采用的荧光光谱法进行了综述,从温度、双分子猝灭过程的速率常数、荧光寿命以及吸收光谱的变化等方面作了论述,从而确定了核酸与有机小分子(染料和药物)之间相互作用的荧光猝灭类型;总结了结合常数、荧光给体-受体间的作用距离、作用力类型及结合方式的多重计算方法,并分别阐述了核酸与染料及药物在不同结合数下生成常数的计算方法。这对研究核酸与有机小分子之间的作用机理、开发新的核酸探针以及以核酸为靶标的药物分子的设计有一定的指导意义。

关键词 核酸; 有机小分子; 反应机理; 荧光光谱法

中图分类号: O657 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)06-1545-04

引 言

近年来,核酸与有机小分子间相互作用的研究成为研究者所关注的焦点,有机小分子主要包括染料和药物等。核酸与染料反应的研究主要是从核酸的检测深化而来的。利用有机小分子(溴化乙锭、臧红T等)作为光谱探针测定核酸,是核酸测定的主要方法。利用不同染料对核酸的响应程度不同,许金钩等建立了耐尔蓝^[1]和甲基蓝^[2]测定DNA的荧光猝灭法。Bright利用DNA对亚德里亚霉素和光神霉素的荧光增强作用建立了测定淋巴细胞中DNA的方法^[3]。通过药物与核酸的相互作用使探针的荧光光谱发生改变,可以了解二者的相互作用机理^[4]。荧光光谱法是研究核酸与有机小分子相互作用机理的主要手段。一些有机小分子可与核酸等生物大分子结合且其光谱呈现出能量转移特征,即发生荧光的加强或猝灭。从这种现象可以得到许多信息,特别是可用来测定生物大分子与某些基团之间的距离,因此常被称为“光谱尺”^[5-7]。溴化乙锭(EB)是应用最早的荧光探针,被广泛应用于核酸与有机小分子的相互作用研究和抗癌药物的筛选^[8-10],常作为其他有机染料与核酸作用机理的研究基础^[11-13]。

1 利用荧光猝灭确定核酸与有机小分子的作用类型

外加分子与荧光体分子相互作用引起荧光强度降低的现象称为荧光猝灭。荧光猝灭作用分为动态猝灭和静态猝灭两类;动态猝灭与静态猝灭可以通过以下几个方面来确定。

1.1 温度的影响

动态猝灭是猝灭剂和荧光体的激发态分子之间的相互作用过程,依赖于扩散运动。温度升高,扩散运动加快,扩散系数增大,因此,双分子动态猝灭常数增大。根据Stern-Volmer方程^[14,16]

$$F_0/F = 1 + K_{SV}c_Q = 1 + K_q\tau_0c_Q \quad (1)$$

其中, F_0 为未加入猝灭剂时荧光体的荧光强度, F 为猝灭剂浓度为 c_Q 时的荧光强度, K_{SV} 为Stern-Volmer猝灭常数, K_q 为双分子动态猝灭过程的速率常数, τ_0 为猝灭剂不存在时荧光体的寿命。以 $(F_0/F)^{-1}$ 对 c_Q 作图,得到荧光猝灭的Stern-Volmer图,从中可以看出,曲线斜率随温度的增加而减小,即随着温度的升高,动态猝灭速率常数将增大。

静态猝灭是猝灭剂和荧光体分子在基态生成不发光的配合物,从而导致荧光体荧光强度降低的过程。温度升高,配合物的稳定性下降,静态猝灭常数减小^[16]。

1.2 双分子猝灭过程的速率常数的影响

收稿日期: 2009-09-08, 修订日期: 2009-12-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(20577016), 山东省自然科学基金项目(Y2008B44)和山东省重点学科基金项目(XTD0705)资助

作者简介: 张 诺, 1985年生, 济南大学化学化工学院硕士研究生 e-mail: sennuo_1225@163.com

* 通讯联系人 e-mail: sdjndxwq@163.com

从荧光猝灭的 Stern Volmer 图中猝灭曲线的斜率可求得猝灭常数 K_q 。各类猝灭剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ，如果 K_q 远远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ，则证实此猝灭不是由动态碰撞引起的，而是猝灭剂与荧光体形成的复合物所引起的静态猝灭^[17]。

1.3 荧光寿命的影响

荧光猝灭类型是静态猝灭时，猝灭剂的存在不会改变荧光体激发态的寿命；动态猝灭中，猝灭剂的存在会使荧光体寿命缩短，荧光量子产率降低。这是区分静态猝灭与动态猝灭的最确切方法^[18]。

1.4 吸收光谱的变化

动态猝灭只影响到荧光分子的激发态，并不会改变荧光物质的吸收光谱。静态猝灭中基态配合物的生成会引起荧光物质吸收光谱的改变。因此，根据荧光体吸收光谱是否发生改变也可以判断荧光猝灭的类型^[16]。

2 结合常数的测定

荧光强度、猝灭剂浓度与静态猝灭结合常数 (K_{LB})^[19-21]符合 Lineweaver Burk 双倒数函数关系

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + L_{LB}^{-1} F_0^{-1} c_0^{-1} \quad (2)$$

根据 Lineweaver Burk 双倒数图中直线的截距和斜率可以求得 K_{LB} 。

3 荧光给体-受体间作用距离的求取

根据福斯特能量转移^[22]理论，荧光体与猝灭剂之间的能量转移效率 (E) 和两者之间的距离 (r) 以及 E 为 50% 时对应的临界距离 (R_0) 的关系为

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (3)$$

其中 R_0 可表示为

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (4)$$

$$J = \sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda \sum F(\lambda) \Delta \lambda \quad (5)$$

能量转移效率 E 又可由下式测定

$$E = 1 - F/F_0 \quad (6)$$

F 和 F_0 分别为能量接受体存在和不存在时能量给予体的荧光发射强度。综合 (3) ~ (6) 式可知，只要得到 E 、 K^2 (偶极空间的取向因子)、 N (介质的折射指数)、 Φ (给体的光量子产率) 和 J (给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱的重叠积分)，就可以计算出 R_0 和 r 。

能量转移效率的大小与药剂对生物大分子的影响、两者间的作用强度有直接关系，因而 E 和 r 这两个参数的求取对药剂功能的研究有参考价值^[5]。能量转移技术也可用于 DNA 点突变的探测、跟踪记录分子结构的动态变化，从而为反应机理的研究提供大量宝贵信息^[23,24]。

4 作用力类型的确定

核酸与有机小分子之间的作用力主要包括氢键、范德华

力、静电引力和疏水作用力等。根据反应前后热力学焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小，可以判断二者的相互作用力类型。当 $\Delta H > 0$ ， $\Delta S > 0$ 时，此过程为吸热反应，二者之间的作用力主要是疏水作用力^[25,26]；当 $\Delta H < 0$ ， $\Delta S > 0$ 时，此过程为放热反应，二者之间的作用力主要是静电引力^[27]；当 $\Delta H < 0$ ， $\Delta S < 0$ 时，此过程为吸热反应，二者之间的作用力主要是氢键和范德华引力^[28]。Ross^[29] 等也认为疏水作用力对体系的 ΔH 和 ΔS 产生正的贡献，氢键或者范德华力使 ΔH 和 ΔS 变负，静电作用力使 $\Delta H \approx 0$ ， $\Delta S > 0$ 。

此外，在水溶液中，无论是生物大分子还是有机小分子都是溶剂化的，水分子以及其他共存离子的存在对体系的自由度会产生一定影响。因此，对于实际体系，其宏观表现是这几种力协同作用的结果^[30]。

5 结合方式的探讨

有机小分子与核酸的结合方式与二者的分子结构、分子构象及电子云分布密切相关^[31]，其结合区位于核酸的碱基、磷酸骨架以及戊糖环部分，结合模式归纳起来大致可分为非共价结合 (包括静电、嵌插和沟槽结合)、共价结合、剪切作用和长距组装^[32]。

阴离子猝灭剂可使有机小分子的荧光猝灭，其猝灭程度可通过 Stern Volmer 猝灭常数 K_{SV} 的大小来衡量。当有机小分子与核酸发生结合反应后，通过阴离子猝灭剂对该有机小分子荧光猝灭的 K_{SV} 的变化可推断该有机小分子与核酸的作用方式。在核酸存在的情况下，如果 K_{SV} 减小，表明有机小分子与核酸的结合是嵌入式^[33]；如果 K_{SV} 增大，则表明有机小分子与核酸的结合是沟槽式^[34]。这是因为，DNA 的磷酸骨架带有负电荷，对阴离子猝灭剂有强烈的排斥作用，当有机小分子嵌入到 DNA 的碱基对时，可以受到有效的保护而使其猝灭程度减小；当有机小分子与 DNA 发生沟槽结合时，有机小分子作用于 DNA 的大沟或小沟上，暴露在溶剂分子中，因而得不到 DNA 的保护，更容易受到阴离子猝灭剂的进攻^[33,35]。

有机小分子与核酸作用后荧光偏振的变化情况也是判断有机小分子是否与核酸发生嵌插作用的又一标准^[36]。通常，当有机小分子嵌插到碱基中时，其转动受阻，荧光偏振值会随之变大，仅与磷酸根作用或仅产生沟槽键合不会引起荧光偏振值的增大^[37]。文献^[38]利用荧光偏振方法研究了小分子与 DNA 之间的相互作用，小分子的荧光偏振随着 DNA 浓度的增加而增大，由此推断小分子与 DNA 发生了嵌插作用。

6 核酸与有机小分子不同结合数下的生成常数

在静态猝灭作用中，荧光强度与猝灭剂的关系可由荧光 - 猝灭剂之间的结合常数表达式推导出^[39]。设生物大分子有 n 个相同且独立的结合位置，则有



其生成常数 K 为

$$K = [A_n B] / [A]^n [B] \quad (8)$$

(8) 式中 $[A]$ 是猝灭剂浓度, $[B]$ 是游离核酸浓度, $[A_n B]$ 是配合物浓度。若荧光体总浓度是 $[B_0]$, 则 $[A_n B] = [B_0] - [B]$ 。

在静态猝灭中, 荧光体的荧光强度与其游离浓度成正比

$$[B] / [B_0] = F / F_0 \quad (9)$$

合并(8)和(9)式可得

$$\log(F_0 - F) / F = \log K + n \log [A] \quad (10)$$

以 $\log(F_0 - F) / F$ 对 $\log[A]$ 作图, 通过斜率和截距可求得有机小分子与核酸的结合常数 K 及结合位点数 n 。文献[30]通过此法对吗啡与核酸之间的相互作用进行了光谱学研究, 结果与其他方法吻合。

7 结束语

核酸与有机小分子化合物作用的形式和位点影响了核酸的生理和物理化学性质, 改变了核酸的转移和复制, 研究核酸与有机小分子之间反应机理的荧光特性对药物等小分子的作用机理以及以核酸为靶标的药物分子的设计有一定的指导意义。随着基因组学的研究深入, 越来越多的有机小分子与核酸之间的相互作用被研究并应用于核酸的分析检测, 新的染料探针、新的药物和有机试剂也被应用于 DNA 结构与性质的分析之中。尽管这方面的研究已经取得了一定的成果, 但仍有许多问题尚待解决。生物学、医学、物理学及信息学等学科间的相互融合将会促进该领域的深入发展。

参 考 文 献

- [1] CHEN Q C, LI D H, ZHAO Y, et al. *Analyst*, 1999, 124(6): 901.
- [2] LI W Y, XU J G, GUO X Q, et al. *Anal. Lett.*, 1997, 30(3): 527.
- [3] Bright T H. *Anal. Biochem.*, 1976, 70: 635.
- [4] YANG Zhou sheng, YU Jurr sheng, CHEN Hong-yuan(杨周生, 于俊生, 陈洪渊). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2002, 23(8): 1457.
- [5] XI Xiao-li, YANG Mar man, HAN Xiao-jian, et al(席小莉, 杨曼曼, 韩小见, 等). *Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报)*, 2001, 17(6): 781.
- [6] WANG Feng, YANG Jing he, WU Xia, et al. *Spectrochimica Acta Part A*, 2007, 67: 385.
- [7] LI Jurr fen, WEI Yur Xia, WEI Yarr Li, et al. *Journal of Luminescence*, 2007, 124: 143.
- [8] GUO Maolin, YANG Pin, YANG Bir sheng, et al(郭茂林, 杨 频, 杨斌盛, 等). *Chinese Sci. Bull.(科学通报)*, 1995, 40(13): 1187.
- [9] XU Chun, HE Pir gang, FANG Yur zhi(徐 春, 何品刚, 方禹之). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2000, 21(8): 1187.
- [10] Zhou Y L, Li Y Z. *Biophys. Chem.*, 2004, 107(3): 273.
- [11] CHEN Bei, TANG Hong wu(陈 蓓, 唐宏武). *Journal of Analytical Science(分析科学学报)*, 1997, 13(1): 1.
- [12] Strothkamp K G, Strothkamp R E. *J. Chem. Educ.*, 1994, 71(1): 77.
- [13] ZHANG Guo wen, QUE Qing min, PAN Jurr hui(张国文, 阙青民, 潘军辉). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2008, 28(8): 1910.
- [14] CHEN Guo zhen, HUANG Xiar zhi, XU Jurr gou, et al(陈国珍, 黄贤智, 许金钧, 等). *Fluorescence Analytical Approach(荧光分析法)*, Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 116.
- [15] YAN Qir jun, HE Yu, SONG Gong-wu(闫秋君, 何 瑜, 宋功武). *Journal of Hubei University • Natural Science(湖北大学学报 • 自然科学版)*, 2005, 27(1): 46.
- [16] LI Hua cen, GAO Jiarhua, GONG Xue yun(李华岑, 高建华, 龚雪云). *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(光谱实验室)*, 2003, 20(5): 676.
- [17] ZHU Keng, TONG Sheer yang(朱 铿, 童沈阳). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 1997, 55: 405.
- [18] YANG Mei ling, YANG Pei ju, SONG Yur min(杨美玲, 杨培菊, 宋玉民). *Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报)*, 2005, 21(4): 483.
- [19] Kusmierk J T, Jensen D E, Spengler S J. *J. Org. Chem.*, 1987, 52: 2374.
- [20] LI Zaoying, XIE Zheng, ZHU Xurr jin, et al(李早英, 谢 征, 朱训进, 等). *Journal of Wuhan University of Technology • Materials Science Edition(武汉大学学报 • 理学版)*, 2002, 48(6): 689.
- [21] YANG Mar man, YANG Pin, ZHANG Li wei(杨曼曼, 杨 频, 张立伟). *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, 1994, 39(1): 31.
- [22] Förster T. *Ann. Phys.*, 1948, 2: 55.
- [23] Parkhurst K M, Parkhurst L J. *Biochemistry*, 1995, 34(1): 285.
- [24] WEI Yr nan, LI Yuar zong, CHANG Werr bao, et al(魏亦男, 李元宗, 常文保, 等). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 1998, 26(4): 447.
- [25] Pesavento M, Profumo A. *Talanta*. 1991, 38(10): 1099.
- [26] JIANG Chong-qiu, WANG Jing zheng(江崇球, 王敬政). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 1999, 27(8): 894.

- [27] Klotz I M, Urquhart J M. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(3): 847.
- [28] Philip D, Ross R. Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096.
- [29] Ross P D, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20: 3096.
- [30] WANG Feng, HUANG Wei, TANG Bo, et al(王峰, 黄薇, 唐波, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2007, 35(1): 111.
- [31] CI Y X, ZHENG Y G, TIE J K, et al. Anal. Chim. Acta, 1993, 282: 695.
- [32] ZHANG Rongying, PANG Daï wen, CAI Ru xiu(张蓉颖, 庞代文, 蔡汝秀). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 1999, 20(8): 1210.
- [33] Kumur C V, Asuncion E H. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1992, 6: 470.
- [34] Kumar C V, Turner R S, Asuncion E H. Photochem. Photobiol. A: Chem., 1993, 74: 231.
- [35] Berman H M, Young P B. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1981, 10(1): 87.
- [36] LI Rui, REN Hai ping, SUN Yarr ting, et al(李锐, 任海平, 孙艳亭, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2006, 34(12): 1801.
- [37] Kumar C V, Asuncion E H. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115(19): 8547.
- [38] LI W Y, XU J G, GUO X Q, et al. Spectrochim Acta Part A, 1997, 53(5): 781.
- [39] FENG Xr zeng, BAI Chur li, LIN Zhang, et al(冯喜增, 白春礼, 林璋, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1998, 26(2): 154.

Fluorescence Research on Reaction Mechanism of Nucleic Acid with Small Organic Molecules

ZHANG Nuo, WU Dan, HAN Yarr yan, CAI Yarr yan, LI Ru, ZHAO Yarr fang, WEI Qin*

Shandong Provincial Key Laboratory of Fluorine Chemistry and Chemical Materials, School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Jinan, Jí nan 250022, China

Abstract The interaction mechanism of nucleic acid with small organic molecules plays an important role in the recognition of the structure and function of nucleic acids, which can also reveal the biological function of nucleic acids and the mechanism of some drugs. Research on the interaction between nucleic acid and small organic molecules plays an important part in simulating the life process and exploring the essence of life. In the present article, detailed description of the fluorescence spectroscopy research methods used in this field is presented. The fluorescence quenching types of the interaction between nucleic acid and small organic molecules(including dyes and drugs)are discussed. There are many factors influencing the fluorescence quenching type, including the temperature, the rate constant of bimolecular quenching process, the fluorescence lifetime, changes of the absorption spectra and so on. So according to different affecting factors, the fluorescence quenching type can be determined based on corresponding theories. Many different kinds of calculation methods are also summarized, including the calculations of the binding constant, the distance between fluorescence donor and receptor, the interaction force type and the binding mode of nucleic acid with small organic molecules. Furthermore, the formation constant of nucleic acid with small organic molecules is studied with different binding numbers. These conclusions have guiding significance for studying the interaction between nucleic acid and small organic molecules. These results can also provide guidance for the development of new nucleic acid probe, and the design of new drug molecules, of which nucleic acid is the important target.

Keywords Nucleic acid; Small organic molecules; Reaction mechanism; Fluorescence spectroscopy

(Received Sep. 8, 2009; accepted Dec. 13, 2009)

* Corresponding author